

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 442**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2005 E 05727510 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1736169**

54 Título: **Potenciador de la actividad anticancerosa en terapia viral y método de prevención o de tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

31.03.2004 JP 2004105487

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2014

73 Titular/es:

**TODO, TOMOKI (100.0%)
1-3-17-110, ETCHUJIMA KOTO-KU
TOKYO 1350044, JP**

72 Inventor/es:

TODO, TOMOKI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 463 442 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Potenciador de la actividad anticancerosa en terapia viral y método de prevención o de tratamiento del cáncer

5 **Antecedentes**

La presente invención se refiere a un potenciador de la actividad anticancerosa en terapia viral, que contiene, como componente efectivo, interleucina. La presente invención también se refiere a un método de prevención o de tratamiento del cáncer, en el que la interleucina se coadministra con el virus del herpes simple recombinante.

10 Basándose en el conocimiento de los mecanismos citomoleculares de infección viral, en los mecanismos genéticos relacionados con la carcinogénesis y en los mecanismos biológicos moleculares causantes de la proliferación de células cancerosas, en los últimos años se han producido virus que se replican selectivamente en células cancerosas por modificación del genoma viral usando técnicas de modificación por ingeniería genética, y se están realizando intentos para aplicar estos virus en el tratamiento del cáncer.

15 En 1991, Martuza et al., propusieron el concepto de la aplicación de virus recombinantes para el tratamiento del cáncer (véase, por ejemplo, Martuza, R.L. et al., Science 252: 854-6 (1991)). Muchos virus son propiamente patógenos y también tienen un efecto negativo sobre las células normales cuando se administran inatenuados, por ejemplo, a seres humanos. Sin embargo, a través de la delección de genes específicos por recombinación genética, pueden construirse virus que son incapaces de sintetizar ADN viral en células normales y por tanto, son incapaces de replicarse en células normales, pero son capaces de replicarse en células tumorales proliferantes debido a una compensación en su interior durante la función de los genes delecionados.

20 Los virus oncolíticos, que se han modificado por recombinación genética, para replicarse selectivamente solo en las células cancerosas, se replican *in situ* cuando se infectan en células cancerosas y mediante este proceso ocasionan la destrucción de las células cancerosas hospedadoras. Los virus replicados se propagan después al medio circundante y vuelven a infectar a células cancerosas, después de lo cual muestran una actividad antitumoral por repetición de las etapas de replicación, muerte celular, propagación e infección. Por otro lado, los virus terapéuticos que tienen las células normales infectadas, son incapaces de replicarse y como resultado de esto no producen daños a tejidos normales.

25 Un ejemplo de un virus mutante de este tipo es el virus mutante dlsptk, que se construye por delección del gen de la timidina quinasa (tk) del genoma del virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-1). El dlsptk es incapaz de sintetizar ADN viral en células normales y por tanto es incapaz de replicarse en células normales; sin embargo, la alta actividad tk de las células tumorales proliferantes compensa la pérdida de la tk viral y el virus es entonces capaz de replicarse. En modelos tumorales cerebrales de animales, se ha demostrado que la infección de células tumorales con dlsptk da como resultado la aparición de un efecto terapéutico a través de la rotura selectiva de únicamente células tumorales (véase, por ejemplo, Martuza, R.L. et al., Science 252: 854-6 (1991)).

35 El HSV-1 se clasifica como un virus de ADN bicatenario con envoltura y tiene las siguientes características que son ventajosas para el tratamiento del cáncer: 1) puede infectar muchos tipos de células humanas; 2) se ha esclarecido el ciclo de vida y la secuencia genómica de este virus; 3) se conoce la función de la mayoría de los genes de este virus y puede aplicarse manipulación genética; y 4) el gran tamaño del genoma viral (aproximadamente 152 kb) hace que sea posible integrar genes grandes o números múltiples de genes. El HSV-1 también tiene las siguientes ventajas en cuanto a su aplicación clínica: 5) la muerte de toda la población de células tumorales es posible a una baja multiplicidad de infección (MOI); 6) se dispone de fármacos antivirales que inhiben la replicación viral; 7) los anticuerpos anti-HSV-1 en la sangre no afectan a la propagación de infección de célula a célula por el virus; 8) dado que existen ratones y primates no humanos sensibles al HSV-1, puede realizarse una evaluación preclínica sobre la seguridad y eficacia en animales; y 9) el ADN viral no se integra en el genoma de la célula hospedadora y permanece episomal.

40 Dentro de la esfera de virus oncolíticos, hasta ahora el autor de la presente invención ha desempeñado una función importante en el desarrollo de G207, un HSV-1 con delección del gen γ 34.5 con un gen ICP6 inactivado (consultar, por ejemplo, Chahlavi, A. et al., Neoplasia 1: 162-169 (1999); Hunter, W.D. et al., J. Virol. 73: 6319-6326 (1999); Chahlavi, A. et al., Gene Ther. 6: 1751-1758 (1999); Nakamura, S. et al., Glia 28: 53-65 (1999); Todo, T. et al., Hum. Gene Ther. 10: 2741-2755 (1999); Todo, T. et al., Hum. Gene Ther. 10: 2869-2878 (1999); Todo, T. et al., Cancer Gene Ther. 7: 939-946 (2000); Markert, J.M. et al., Gene Ther. 7: 867-874 (2000); Todo, T. et al., Mol. Ther. 2: 588-595 (2000); Nakano, K. et al., Mol. Ther. 3: 431-437 (2001); Varghese, S. et al., Hum. Gene Ther. 12: 999-1010 (2001); Jorgensen, T.J. et al., Neoplasia 3: 451-456 (2001); y Todo, T. et al., San Diego, Academic Press: 45-75 (2001)), y también ha inventado y desarrollado G47 Δ , un HSV-1, en el que, además de los dos genes ya mencionados, el gen ICP47 (conocido también como gen α 47) también está inactivado (consultar, por ejemplo, la Solicitud US Publicada 2002/0187163A1; Todo, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6396-6401 (2001)). Aunque tanto el G207 como el G47 Δ han perdido la capacidad de replicarse en tejido normal, conservan la capacidad de replicarse en células tumorales. Debido a la modificación de tres genes en su interior, el G47 Δ es en particular muy

útil como virus terapéutico ya que presenta una alta especificidad tumoral y es altamente inocuo.

Adicionalmente, en investigaciones realizadas utilizando ratones con sistemas inmunitarios normales, el autor de la presente invención descubrió que el HSV-1 genéticamente recombinante, después de inoculación intratumoral, no solo se proliferaba dentro del tumor, mediante lo cual presenta una actividad destructora celular, sino que también suscita una inmunidad antitumoral específica, potenciando por lo tanto su actividad antitumoral (consultar, por ejemplo, Todo, T. et al., Hum. Gene Ther. 10: 2741-2755 (1999); Todo, T. et al., Hum. Gene Ther. 10: 2869-2878 (1999); y Toda M. et al., Hum. Gene Ther. 10: 385-393 (1999)). Por ejemplo, cuando el G207 se inoculó por vía intratumoral en tumores N18 (neuroblastoma) generados por vía subcutánea en ratones A/J, se indujo una inmunidad antitumoral sistémica asociada con una elevación de actividad por linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos contra células N18, y el crecimiento de tumores subcutáneos o intracelulares distantes también se inhibió. Ratones curados por tratamiento con G207 adquieren una inmunidad protectora específica tumoral y la elevación en la actividad CTL específica de células N18 persiste durante más de un año. En otras palabras, la inoculación intratumoral del HSV-1 oncolítico también actúa como una vacuna contra el cáncer *in situ*, que es extremadamente ventajosa desde un punto de vista clínico por las siguientes razones: no se requiere identificación de un antígeno tumoral; mayor conveniencia en comparación con el método *ex vivo* que requiere, entre otras cosas, el cultivo de células tumorales; y la posibilidad de que el tratamiento del foco primario también sea capaz de suprimir el foco metastásico a través de una inmunidad antitumoral sistémica Hara I et al (Cancer Gene Therapy, vol. 7, páginas 83 a 90, 2000), describen la administración de IL-18 e IL-12 en células tumorales. Toda M et al (J. Immunol., vol. 160, páginas 4457 a 4464), desvelan un HSV que expresa IL-12. El documento WO2002/076216 se refiere a vectores virales, tales como vectores HSV-1 y métodos de uso de dichos vectores para tratar enfermedades. Fujioka et al (J. of Virology, mar. 1999, páginas 2401 a 2409) examinan el efecto de IL-18 contra infección aguda del HSV-1. Malmgaard et al (J. of General Virology, 2003, 84. 2497-2500) investigan el efecto de IL-12 e IL-18 sobre la infección del HSV-2.

Sumario

En el tratamiento del cáncer utilizando un virus del herpes simple recombinante (denominado más adelante simplemente HSV recombinante) tal como el G207, la introducción de una cantidad de virus suficiente en el tejido tumoral es un requisito previo para poner de manifiesto su efecto. Sin embargo, no siempre es necesario que esta circunstancia ideal se realice clínicamente.

Un método y/o un fármaco que pudiesen potenciar la actividad anticancerosa del HSV recombinante sin producir efectos secundarios haría que el tratamiento viral fuese más útil. Además, si entre las actividades anticancerosas proporcionadas por terapia viral, la inmunidad antitumoral en particular pudiese potenciarse, entonces la aparición de una actividad anticancerosa podría esperarse incluso en localizaciones fuera de tejido canceroso inoculado con el virus y a un efecto terapéutico más alto de lo que podría esperarse incluso en un foco metastásico.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un virus del herpes simple recombinante que se replique selectivamente en células cancerosas para su uso en la prevención o en el tratamiento del cáncer en un paciente, que comprende la coadministración de interleucina 18 y el virus del herpes simple recombinante simultánea o secuencialmente, en el que la coadministración de interleucina 18 es sistémica, y en el que el gen γ 34.5 y el gen ICP6 del virus del herpes simple recombinante se han delecionado o inactivado. Este fármaco potencia, de manera segura y eficaz, la actividad anticancerosa de la terapia viral y en particular potencia, de manera segura y eficaz, la respuesta inmunitaria antitumoral en terapia viral.

El autor de la presente invención realizó una amplia e intensa investigación a la vista de las circunstancias citadas anteriormente y como resultado descubrió que, cuando el HSV recombinante, que prolifera selectivamente en células cancerosas, se administra como una terapia contra el cáncer, el efecto terapéutico puede potenciarse mediante la coadministración de interleucina 18 (en lo sucesivo, en presente documento, abreviada como IL-18) y este efecto puede obtenerse a un grado satisfactorio incluso en localizaciones fuera del tejido canceroso que recibe la inoculación del HSV. También se descubrió que, cuando la interleucina 18 se administraba sistémicamente, este efecto podía potenciarse aún adicionalmente mediante la administración o expresión de la interleucina 12 en el sitio del tumor. La presente invención se llevó a cabo basándose en estos descubrimientos.

Por tanto, la presente invención se refiere a

[1] un potenciador de la actividad anticancerosa en terapia viral, que comprende un virus del herpes simple recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas para su uso en la prevención o tratamiento del cáncer en un paciente, que comprende la coadministración, de manera simultáneo o secuencial, de interleucina 18, como un componente eficaz, y el virus del herpes simple recombinante, en el que la coadministración de la interleucina 18 es sistémica, y en el que el gen γ 34.5 y el gen ICP6 del virus del herpes simple recombinante se han delecionado o inactivado;

[2] el potenciador de acuerdo con [1] en el que la actividad anticancerosa comprende suscitar inmunidad antitumoral;

[3] el potenciador de acuerdo con [1] o [2], en el que el gen ICP47 del virus del herpes simple recombinante

también se ha deletado o inactivado;

[4] el potenciador de acuerdo con una cualquiera de [1] a [3], en el que el gen que codifica interleucina 12 se ha insertado como una construcción que puede expresarse en el ADN genómico del virus del herpes simple recombinante;

[5] la presente descripción se refiere a un método de prevención o tratamiento del cáncer, que comprende la coadministración de interleucina 18 y un virus del herpes simple recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas, de manera simultánea o secuencial, en el que la coadministración de interleucina 18 es sistémica, y en el que el gen γ 34.5 y el gen ICP6 del virus del herpes simple recombinante se han deletado o inactivado.

En este método, la interleucina 12 se administra adicionalmente por vía local en un tejido tumoral;

[6] el método de acuerdo con [5], en el que un gen que codifica la interleucina 12 se ha insertado como una construcción que puede expresarse en el ADN genómico del virus del herpes simple recombinante;

[7] el método de acuerdo con [5] o [6], en el que el gen ICP47 del virus del herpes simple recombinante también se ha deletado o inactivado;

[8] el método de acuerdo con cualquiera de [5] a [7], en el que el método de prevención o tratamiento del cáncer es un método de prevención o tratamiento del cáncer en una localización fuera del tejido tumoral inoculado con el virus del herpes simple recombinante.

La presente invención puede aumentar sustancialmente la eficacia de la terapia viral mediante la coadministración del virus del herpes simple recombinante, que se replica selectivamente en células cancerosas, y la interleucina 18, a una dosis lo suficientemente baja para que carezca de toxicidad, en el que la coadministración de interleucina 18 es sistémica y en el que el gen γ 34.5 y el gen ICP6 del virus del herpes simple recombinante se han deletado o inactivado. Además, cuando la IL-18 se administra sistémicamente, puede obtenerse una potenciación adicional en esta eficacia mediante la administración de IL-12 en el sitio del tumor. La coadministración de estas interleucinas en particular potencia la inmunidad antitumoral suscitada por la terapia viral y por lo tanto también aumenta el efecto terapéutico en localizaciones fuera del tejido tumoral que ha sido inoculado con el virus. Dado que esto indica que el método de acuerdo con la presente invención es también eficaz en el foco metastático generado en una pluralidad de sitios, el método de acuerdo con la presente invención aumenta la utilidad de la terapia viral a otro nivel.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo sobre los efectos de la coadministración de G47 Δ e IL-18 en ratones que tienen tumores Neuro2a subcutáneos.

La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo que verifica la inducción por coadministración de G47 Δ /IL-18 de esplenocitos reactivos a estimulación por células tumorales.

La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo sobre la actividad anticancerosa debida a la coadministración de G47 Δ /IL-18 en tejido tumoral distante no inoculado con G47 Δ .

La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo sobre efecto de la coadministración de G47 Δ e IL-18 en ratones desnudos.

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo sobre la influencia de la administración de IL-18 en la replicación viral por G47 Δ en tejido canceroso.

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo sobre efecto de la coadministración de G47 Δ e IL-18 en presencia de empobrecimiento de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+.

La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo sobre los efectos de la coadministración de G47 Δ e IL-18 en tumores cerebrales.

La Figura 8 muestra la estructura de T-mflIL12, que es ADN viral de G47 Δ que tiene un gen que codifica IL-12 insertado en su interior como una construcción que puede expresarse.

La Figura 9 muestra los resultados de ensayos sobre la actividad antitumoral en tumores que han recibido una inoculación viral (izquierda) y tumores distantes (derecha), para la coadministración de IL-18 (administración sistémica) y de G47 Δ que expresa IL-12 (administración local en el tumor del lado izquierdo), en ratones que tienen tumores Neuro2a subcutáneos en ambos lados.

Descripción detallada

A continuación se aclara el significado de los términos y demás expresiones, utilizados en la presente invención y también se ofrece una descripción detallada de la misma.

La "terapia viral" citada en la presente invención se refiere a una terapia que cura el cáncer a través de la administración de un virus que se replica selectivamente en células cancerosas y que no es capaz de replicarse en células normales, destruyendo por tanto únicamente células cancerosas. El virus se proporciona con su capacidad de replicación selectiva por modificación mediante técnicas de ingeniería genética o por mutación natural, o tiene esta propiedad originalmente.

El virus utilizado en la terapia viral de acuerdo con la presente invención es el HSV recombinante que se ha modificado para replicarse selectivamente en células cancerosas, en el que el gen γ 34.5 y el gen ICP6 se han

delecionado o inactivado. El gen ICP47 también puede estar delecionado o inactivado.

El producto génico γ 34.5 es una proteína que antagoniza la función de la proteína quinasa (PRK) activada por ARN bicatenario. En células normales, la PKR se fosforila en respuesta a inyección del HSV-1, y esta fosforila el factor de inicio de la traducción eIF-2 α , dando como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas virales. Por lo tanto, si el gen γ 34.5 no funciona, la replicación del virus se inhibe en células normales. Sin embargo, en células cancerosas, y particularmente en células en las que la ruta de transducción de señal Ras se ha activado, dado que la PKR ya está inhibida, la replicación del virus es posible incluso en el HSV-1 mutante en el que el gen γ 34.5 se ha delecionado.

- 5
- 10 El gen ICP6 es un gen que codifica una subunidad grande de la ribonucleótido reductasa (RR). Si el gen de la RR se elimina o inactiva, el HSV-1 no puede replicarse en células que no se dividen (células normales). Sin embargo, la replicación es posible en células que se dividen activamente en las que la actividad RR está aumentada por compensación de la enzima perdida del virus.
- 15 La proteína ICP47 disminuye la expresión del MHC de clase I de células infectadas inhibiendo el transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP) y actúa para permitir que el virus se escape de la inmunovigilancia del hospedador. Por consiguiente, la inmunidad antitumoral se potencia si el gen ICP47 está inactivado dado que la expresión del MHC de clase I se conserva en células cancerosas infectadas.
- 20 El G207 citado anteriormente es un ejemplo de HSV en el que el gen γ 34.5 y el gen ICP6 se han delecionado o inactivado, y el G47 Δ citado anteriormente es un ejemplo de HSV en el que tres genes, γ 34.5, ICP6 e ICP47, se han delecionado o inactivado. El G47 Δ es el mejor adaptado para terapia viral porque su mutación triple da como resultado una replicación tumoral muy específica y muy segura.
- 25 El experto habitual en la técnica puede construir adecuadamente estos HSV recombinantes de la invención mediante los métodos descritos en la bibliografía citada anteriormente o mediante los métodos basados en esta.

De acuerdo con la presente invención, el potenciador de la actividad anticancerosa en terapia viral contiene, como componente eficaz, interleucina. La interleucina se refiere a una familia de proteínas bioactivas producidas por células inmunocompetentes, tales como linfocitos, monocitos y macrófagos, y hasta la fecha se conocen 29 especies, de IL-1 a IL-29. Cuando la interleucina 18, el potenciador de actividad anticancerosa de acuerdo con la presente invención, se usa en combinación con terapia viral, puede potenciar la actividad anticancerosa de la misma. La IL-18 se ha clonado como una citocina sintetizada por células de Kupffer. La presente invención también puede implicar la administración de IL-12. La IL-12 es un factor estimulante de linfocitos citolíticos naturales. La IL-23 tiene la misma subunidad p40 que la IL-12 y se descubrió como un factor que inducía fuertemente la proliferación de linfocitos T de memoria (Córdoba-Rodríguez, R.; Expert Opin. Biol. Ther. Agosto 2003: 3(5) 715-23), la IL-27 (Córdoba-Rodríguez, R.; Expert Opin. Biol. Ther. Agosto 2003: 3(5) 715-23), y etc., en el que la IL-18 e IL-12 están bien adaptadas entre ellas.

- 30
- 35
- 40 La IL-18 es una citocina inflamatoria con un peso molecular de 18.000 que se conoce como factor inductor de interferón γ (IGIF). Se sabe que la IL-18 tiene, entre otras, las siguientes actividades biológicas: inducción de la producción de interferón γ (denominado a continuación IFN- γ) por linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales (*NK cells*), potenciación de la actividad de linfocitos citolíticos naturales, potenciación de la expresión del ligando Fas por linfocitos, e inducción de la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.
- 45
- 50 Aunque también se ha descrito que las propias interleucinas presentan actividad anticancerosa, estas deben administrarse a altas concentraciones para obtener resultados satisfactorios y su utilidad está por lo tanto limitada desde el punto de vista de efectos secundarios. Sin embargo, cuando se usan en combinación con el HSV recombinante como potenciador de actividad anticancerosa de acuerdo con la presente invención, puede obtenerse una actividad anticancerosa sustancialmente más alta en comparación con el uso del virus en solitario mediante la administración de interleucina y una dosis suficientemente baja que carezca de toxicidad.

Adicionalmente, se ha descubierto que la administración sistémica de IL-18 de acuerdo con la presente invención también proporciona un gran aumento en la actividad anticancerosa en localizaciones fuera del tejido tumoral inoculado con el virus. Esto demuestra que la IL-18, entre las actividades anticancerosas ejercidas por terapia viral, contribuye en particular a fortalecer la inmunidad antitumoral y que la actividad anticancerosa potenciada de acuerdo con la presente invención es también útil para pacientes con cáncer en los que el cáncer ha aparecido en localizaciones múltiples y en pacientes con cáncer que tienen focos metastásicos.

- 55
- 60 También se ha descubierto que los efectos mencionados anteriormente debidos a la administración sistémica de IL-18 en la presente invención se potencian adicionalmente por la administración local de IL-12 en el tejido tumoral. En general, aunque se muestra una actividad anticancerosa cuando la IL-18 y la IL-12 se administran sistémicamente, frecuentemente también se observan fuertes efectos secundarios. Sin embargo, en el método de acuerdo con la presente invención, la actividad anticancerosa, debido al uso conjunto del HSV recombinante y la IL-18, puede potenciarse a través de la administración local de IL-12, mientras que la aparición de efectos secundarios puede
- 65

suprimirse. No hay limitaciones particulares en el procedimiento para la administración local de IL-12, y, por ejemplo, puede usarse un procedimiento en el que un gen que codifique la IL-12 se inserte de manera que pueda expresarse en el ADN genómico del HSV recombinante usado por la presente invención y después administrarse este HSV recombinante. Cuando se emplea este procedimiento, el HSV recombinante puede inocularse solamente en el tejido tumoral por inyección o puede administrarse por vía sistémica mediante, por ejemplo, administración intravenosa. Dado que el HSV recombinante utilizado por la presente invención prolifera selectivamente en células cancerosas, la IL-12 se expresa aun principalmente en células tumorales incluso en el caso de administración sistémica. En el caso de la administración directa de la proteína IL-12 por separado del HSV recombinante, la administración local puede realizarse, por ejemplo, mediante inyección en el tejido tumoral.

La inserción expresable de un gen que codifica la IL-12 en el ADN genómico del HSV recombinante significa la inserción de este gen en el ADN genómico del HSV recombinante en un estado en el que el gen está unido funcionalmente aguas abajo de un promotor. "Unido funcionalmente" se refiere a una unión entre un promotor y el gen de IL-12 que permite el inicio de la transcripción del gen de IL-12 situado aguas abajo del promotor después de la unión de factores de transcripción con el promotor. El promotor puede ser un promotor originalmente presente en el ADN genómico del HSV o puede insertarse en el ADN genómico del HSV en forma de un casete de expresión que incluya el gen de IL-12.

La interleucina incluida en el potenciador de actividad anticancerosa de acuerdo con la presente invención puede ser de origen biológico o puede producirse por técnicas de modificación por ingeniería genética. El tratamiento de seres humanos se realiza más preferentemente usando interleucina humana.

El modo de administración del potenciador de actividad anticancerosa de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitado, y pueden usarse vías orales y no orales. La dosificación en el caso de mamíferos (por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, caballos, primates y etcétera) y particularmente en el caso de administración a seres humanos no puede limitarse específicamente ya que varía en función de la gravedad de la enfermedad, edad, sexo y el peso del paciente, diferencias en sensibilidad, el método de administración, el periodo de administración, el intervalo entre administraciones, la propiedades, composición y tipo de formulación farmacológica, el tipo de componente eficaz y etcétera. Sin embargo, la administración puede realizarse de manera que se proporcione una cantidad eficaz del componente de interleucina de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 5 g, preferentemente de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 500 mg y más preferentemente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 25 mg, o en el caso de administración por inyección, de aproximadamente 0,03 a 3000 µg/kg y preferentemente de 0,1 a 1000 µg/kg. En cada caso, la administración puede realizarse una sola vez o puede dividirse en varias administraciones.

El potenciador de actividad anticancerosa en cuestión, de acuerdo con la presente invención, puede formularse por métodos convencionales, mezclando la interleucina, por ejemplo, con un transportador farmacéuticamente aceptable conocido como tal. La forma de dosificación no está particularmente limitada y puede ilustrarse por comprimidos, polvos, gránulos finos, gránulos, comprimidos revestidos, cápsulas, jarabes, trociscos, inhalantes, supositorios, inyectables, pomadas, pomadas oftálmicas, soluciones oftálmicas, gotas nasales, gotas óticas, cataplasmas y lociones, prefiriéndose particularmente un inyectable. Para preparar la formulación, pueden utilizarse excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, colorantes, agentes enmascarantes de sabor/olor y, si fuera necesario, agentes estabilizantes, emulsionantes, promotores de absorción, tensioactivos, reguladores de pH, conservantes, antioxidantes, y etcétera, habituales. La formulación puede prepararse mediante los métodos habituales combinando los componentes utilizados en forma de materias primas habituales para la formulación del fármaco.

Son ejemplos de aceites vegetales y animales el aceite de soja, el sebo, los glicéridos sintéticos y etc.; como hidrocarburos, la parafina líquida, el escualano, la parafina sólida y etc.; aceites de éster, tales como, octildodecil miristato, isopropil miristato, y etc.; alcoholes superiores, tales como, alcohol cetostearílico, alcohol behenílico, y etc.; resinas de silicona; aceites de silicona; tensioactivos tales como ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de glicerol, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitan, aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno, copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, y etc.; polímeros solubles en agua tales como hidroxietil celulosa, ácido poliacrílico, polímeros carboxivinílicos, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, y etc.; alcoholes inferiores tales como etanol, isopropanol, y etc.; alcoholes polihídricos tales como glicerol, propilenglicol, dipropilenglicol, sorbitol, y etc.; azúcares tales como glucosa, sacarosa, y etc.; polvos inorgánicos de, por ejemplo, anhídrido silícico, silicato de aluminio- magnesio, silicato de aluminio, y etc.; y agua purificada. Como ejemplos de excipientes pueden ser la lactosa, almidón de maíz, sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol, celulosa cristalina, dióxido de silicio y etc. Como ejemplo de aglutinantes pueden ser el alcohol polivinílico, éter polivinílico, metilcelulosa, etilcelulosa, goma arábiga, tragacanto, gelatina, goma laca, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, polivinilpirrolidona, polímero de bloque de polipropilenglicol-polioxietileno, meglumina, citrato cálcico, dextrina, pectina, y etc. Como ejemplo de disgregantes pueden ser el almidón, agar, polvo de gelatina, celulosa cristalina, carbonato cálcico, bicarbonato sódico, citrato cálcico, dextrina, peptina, carboximetilcelulosa cálcica, y etc. Como ejemplo de lubricantes pueden ser el estearato de magnesio, talco, polietilenglicol, sílice, aceites vegetales hidrogenados, etc. Como ejemplo de colorantes pueden ser cualquier colorante permitido para la adición a fármacos. Como ejemplo de agente enmascarador de sabor/olor puede ser polvo de cacao, mentol, polvo aromático, aceite de menta, borneol, polvo de canela, y etc. Como ejemplo

de antioxidantes pueden ser antioxidantes aceptables para la adición a fármacos, tales como ácido ascórbico, α -tocoferol y etc.

5 La formulación oral, por ejemplo, un polvo, gránulo fino, gránulo, comprimido, comprimido revestido, cápsula, y etc., puede prepararse mediante los métodos normales después de la adición del excipiente y, opcionalmente, agente aglutinante, disgregante, lubricante, colorante, enmascarador del sabor/olor, y etc.

Si fuera necesario, un comprimido o gránulo puede revestirse adecuadamente con un revestimiento de azúcar, de gelatina, u otro revestimiento.

10 Una solución, tal como un jarabe, formulación inyectable, solución oftálmica, etc., puede formularse mediante los métodos habituales por la adición de un regulador de pH, disolvente, agente de tonicidad, etc. y opcionalmente por la adición de un agente solubilizante, estabilizante, tampón, agente de suspensión, antioxidante, etc. Estas soluciones también pueden prepararse en materiales liofilizados. Puede administrarse una formulación inyectable de
15 por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. Son ejemplos adecuados del agente de suspensión la metilcelulosa, polisorbitol 80, hidroxietil celulosa, goma arábiga, polvo de tragacanto, carboximetil celulosa sódica, monolaurato de polioxietileno de sorbitán, y etc.; son ejemplos adecuados del solubilizante el aceite de ricino hidrogenado polioxietileno, polisorbitol 80, nicotinamida, monolaurato de polioxietileno de sorbitán, y etc.; son ejemplos adecuados del estabilizante el sulfito sódico, metasulfito sódico, éter, y etc.; y son ejemplos adecuados de
20 conservantes el metil para-hidroxibenzoato, etil para-hidroxibenzoato, ácido sórbico, fenol, cresol, clorocresol, y etc.

La composición farmacológica, tal y como se ha descrito anteriormente, es útil para la prevención o el tratamiento de diversos tipos de cánceres. La terapia viral usando HSV recombinante ya se sabe que es eficaz en una amplia diversidad de cánceres sólidos (consultar, por ejemplo, Todo, T. et al., San Diego, Academic Press: 45-75 (2001)), y
25 la composición farmacológica de acuerdo con la presente invención puede usarse en todos estos cánceres. Son ejemplos específicos de enfermedades los tumores cerebrales, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, melanoma, neuroblastoma, y etc. Entre estos cánceres, es útil para tumores cerebrales y neuroblastoma.

30 La "coadministración" en la presente invención se refiere a un régimen de administración que produce un efecto sinérgico a través del uso conjunto, pero no está, de otra manera, particularmente limitada a la dosis, al método de administración, al intervalo de administración, y etc., y puede realizarse una selección apropiada de acuerdo con el objetivo de la terapia, la enfermedad, y la diana de administración. Por ejemplo, el HSV recombinante y el potenciador de actividad anticancerosa pueden administrarse al mismo tiempo o bien pueden administrarse uno antes que el otro. Además, bien el HSV recombinante o el potenciador de actividad anticancerosa pueden administrarse repetidas veces, o tanto el HSV recombinante como el potenciador de actividad anticancerosa pueden administrarse repetidas veces, y sus frecuencias de administración pueden ser diferentes. En una realización preferida, el potenciador de actividad anticancerosa se administra repetidas veces, y durante este intervalo el HSV recombinante se administra menos frecuentemente.

35 El método de administración del HSV recombinante no está particularmente limitado, y el HSV recombinante puede administrarse como tal o puede formularse mediante métodos convencionales con la mezcla de vehículos, agentes estabilizantes, emulsionantes y etc., farmacéuticamente aceptables, conocidos como tal. La forma de dosificación no está particularmente limitada y puede ilustrarse mediante cápsulas, jarabe, inhalantes, inyectables, pomadas, pomadas oftálmicas, soluciones oftálmicas, gotas nasales, gotas óticas, lociones, y etc., prefiriéndose particularmente un inyectable.

40 La presente descripción también proporciona un método para prevenir o tratar el cáncer, en el que la interleucina se coadministra con un virus del herpes simple recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas. Todos los conceptos de "virus del herpes simple recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas", "interleucina", "coadministración" y "cáncer" se definen en el presente documento solo para el potenciador de actividad anticancerosa descrito anteriormente y por lo tanto no se explicarán otra vez.

45 Entre las interleucinas, el método para la prevención o el tratamiento del cáncer utiliza preferentemente IL-18. La IL-18 se define otra vez en el presente documento solo para el potenciador de actividad anticancerosa descrito anteriormente y por lo tanto no se explicará de nuevo.

50 En el método en cuestión de acuerdo con la presente invención, el HSV recombinante se administra preferentemente por inyección en el tejido tumoral, para prevenir o tratar el cáncer. La inyección en el tejido tumoral puede proporcionar una alta actividad destructora celular con respecto a las células cancerosas dentro de ese tejido. El método de administración se realiza de acuerdo con lo descrito anteriormente.

55 Por otro lado, la interleucina, y particularmente la IL-18, se administran preferentemente de modo sistémico, y en el caso de seres humanos, por ejemplo, puede administrarse por vía sistémica por inyección intravenosa o goteo intravenoso. La administración por vía sistémica posibilita una potenciación de la inmunidad antitumoral inducida por

el HSV incluso fuera de la localización de la inoculación del virus. El método de administración de la interleucina no está particularmente limitado y la interleucina puede administrarse como tal o puede administrarse después de la formulación mediante un método convencional mezclando, por ejemplo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable conocido como tal. El método de formulación se realiza de acuerdo con el ya descrito y no volverá a describirse de nuevo.

El agente para el tratamiento del cáncer, de acuerdo con la presente invención, y el agente para la prevención del cáncer, de acuerdo con la presente invención, contienen HSV recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas y se usa en combinación con la administración sistémica de IL-18, en el que el gen γ 34.5 y el gen ICP6 del HSV recombinante se han deletado o inactivado. Preferentemente, un gen que codifica IL-12 se inserta como una construcción que puede expresarse en el ADN genómico del mismo. Dicho HSV recombinante puede construirse insertando un gen que codifique IL-12 como una construcción que puede expresarse en el genoma viral del G207 descrito anteriormente. Este agente para el tratamiento del cáncer y agente para prevenir el cáncer tienen una concentración y una cantidad de componente eficaz de HSV que se ha optimizado suponiendo la coadministración con IL-18. Incluso cuando el agente para el tratamiento del cáncer, de acuerdo con la presente invención, o el agente para la prevención del cáncer, de acuerdo con la presente invención, se administran sistémicamente, hacen posible la secreción de IL-12 principalmente en células cancerosas porque contiene el HSV recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas.

Preferentemente, el HSV recombinante presente en el agente para el tratamiento del cáncer, de acuerdo con la presente invención, y el agente para la prevención del cáncer, de acuerdo con la presente invención, también tienen un gen ICP47 deletado o inactivado. Dicho HSV recombinante puede construirse insertando un gen que codifique IL-12 como una construcción expresable en el genoma viral del G47 Δ descrito anteriormente, proporcionando de este modo un HSV recombinante incluso inocuo a través de la delección o inactivación del gen ICP47.

Los ejemplos de referencia, de trabajo y de ensayo de la presente descripción que se proporcionan a continuación son de naturaleza ilustrativa, y la presente invención no está limitada a los ejemplos específicos proporcionados a continuación en el presente documento. El experto en la técnica puede ejecutar la presente invención al más alto nivel mediante la adición de diversas modificaciones a los ejemplos proporcionados en el presente documento a continuación, y dichas modificaciones están incluidas en el ámbito de las reivindicaciones de patente de la presente solicitud.

Ejemplo 1

Resultados de la coadministración de IL-18 y G47 Δ

La línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro2a se trasplantó por vía subcutánea (5×10^6) en ratones A/J y esto se usó como modelo de tumor de ratón. Neuro2a es sensible a infección por HSV y es poco inmunogénica en ratones A/J. Por consiguiente, se consideró que este modelo era un modelo en el que la actividad antitumoral ocasionada por inmunidad antitumoral sería el más difícil de realizar. Si en este modelo podría demostrarse la eficacia, también podría suponerse la eficacia de otros cánceres (Todo, T. et al., Cancer Res. 61: 153-161 (2001); Katsanis, E. et al., Cancer Gene Ther., 2: 39-46 (1995); Katsanis, E. et al., Cancer Gene Ther., 3: 75-82 (1996); Heuer, J.G. et al., Hum. Gene Ther., 7: 2059-2068 (1996)).

Una vez que el tejido canceroso alcanzó un diámetro de 5 a 6 mm, los ratones modelo se dividieron en grupos de 6 o 7 animales cada uno. En el caso de los dos grupos a los que se administra G47 Δ , el G47 Δ (1×10^6 ufp) se administró dos veces mediante inyección directa en el tejido canceroso, el día 0 y el día 3. En el caso de los dos grupos que no recibieron G47 Δ (identificados como "control" en la figura), se administró dos veces solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS) que contenía glicerol al 10 % mediante inyección directa en el tejido canceroso, el día 0 y el día 3.

La IL-18 (1 μ g/día) se inyectó por vía intraperitoneal cada día desde el día 0 al día 6 en uno de los grupos que recibieron G47 Δ y en uno de los grupos que no recibieron G47 Δ , mientras que el PBS se inyectó por vía intraperitoneal cada día desde el día 0 al día 6 en el otro grupo que recibió G47 Δ y en el otro grupo que no recibió G47 Δ . El tejido tumoral se midió y su volumen se determinó mediante longitud \times anchura \times altura (mm).

Estos experimentos se realizaron dos veces, y los resultados se muestran en la Figura 1. En ambos experimentos, los grupos a los que se administró G47 Δ tuvieron una tasa inferior de aumento del volumen del cáncer que la de los grupos que no recibieron G47 Δ . En particular, el grupo de coadministración (cuadrado negro) tuvo una tasa de crecimiento sustancialmente inferior que incluso la del grupo que solo recibió G47 Δ (cuadrado blanco), confirmando por tanto que la coadministración ocasiona una potenciación de la actividad anticancerosa.

No se observaron diferencias entre los dos grupos que no recibieron G47 Δ (círculo negro y círculo blanco), lo que confirmó que la administración de 1 μ g/día solo de IL-18 no mostraba actividad anticancerosa.

Ejemplo 2Inducción de inmunidad antitumoral mediante la coadministración de IL-48 y G47Δ

5 El día 20, se separaron tres animales de cada grupo de ratones del grupo que recibió tanto G47Δ como IL-18, del grupo que recibió G47Δ pero no IL-18, del grupo que recibió IL-18 pero no G47Δ y del grupo que no recibió ni G47Δ ni IL-18 en el ensayo mostrado a la derecha de la Figura 1, y se extrajeron esplenocitos de cada ratón. Los esplenocitos (2×10^5 en cada caso) se cultivaron tanto en presencia como en ausencia de células Neuro2a (5×10^5) que se habían tratado previamente con mitomicina C, durante 24 horas en el ensayo de producción de IFN- γ y durante 48 horas en el ensayo de producción de IL-4. El número de células productoras de IFN- γ y el número de células productoras de IL-4 se midió mediante evaluación con ELISPOT.

15 En la Figura 2 se muestran los resultados. Las células productoras de IFN- γ suscitadas por estimulación con células Neuro2a aumentaron sustancialmente en el grupo de coadministración de G47Δ/IL-18 en comparación con los otros grupos. Con respecto a las células productoras de IL-4, el grupo de coadministración de G47Δ/IL-18 presentó un aumento significativo sobre los dos grupos que no recibieron G47Δ, pero no fue significativamente diferente del grupo que recibió G47Δ pero no IL-18.

Ejemplo 3

20

Efecto anticanceroso de la coadministración de G47Δ/IL-18 con respecto a tejido tumoral distante

25 Se confirmó una potenciación de la inducción de inmunidad antitumoral sistémica para la coadministración de G47Δ/IL-18.

30 Se usaron ratones A/J que tenían tejido tumoral Neuro2a subcutáneo (diámetro de aproximadamente 4 mm) tanto en el costado derecho como en el izquierdo. Cada grupo contenía 6 animales. En los grupos que recibían G47Δ, el G47Δ (2×10^6 ufp) se inyectó dos veces, el día 0 y el día 3, solamente en el tejido tumoral en el lado izquierdo y en los grupos que no recibieron G47Δ, se inyectó dos veces PBS que contenía glicerol al 10 %, el día 0 y el día 3, solamente en el tejido tumoral en el lado izquierdo.

35 En los grupos que recibieron IL-18, la IL-18 (1 μ g/día) se inyectó por vía intraperitoneal 7 veces, del día 0 al día 6, mientras que en los grupos que no recibieron IL-18, se inyectó 7 veces PBS, del día 0 al día 6. El tejido tumoral se midió y el volumen se determinó mediante longitud \times anchura \times altura (mm).

40 En la Figura 3 se muestran los resultados. Con respecto al aumento del volumen tumoral en el lado derecho, no hubo diferencias significativas entre el grupo que recibió solo G47Δ (cuadrado blanco) y los grupos que no recibieron G47Δ (círculo blanco y círculo negro); sin embargo, el aumento del volumen tumoral se retrasó significativamente en el grupo de coadministración de G47Δ/IL-18 (cuadrado negro).

45 Estos resultados confirman que, incluso cuando no se observa inmunidad antitumoral sistémica para la administración solo de IL-18 o para la administración solo de G47Δ, se induce una inmunidad antitumoral sistémica por la coadministración de IL-18 y G47Δ a la misma dosis que para la administración en solitario, confirmando de este modo la aparición de una actividad anticancerosa incluso en tejido tumoral distante no inoculado con G47Δ.

Ejemplo 4Efecto de la coadministración de G47Δ/IL-18 en ratones desnudos

50 En este ejemplo, células tumorales Neuro2a se trasplantaron por vía subcutánea en ratones desnudos (que carecen de linfocitos T). Se formaron cuatro grupos de 6 a 7 animales cada uno en los que el tejido tumoral había alcanzado un diámetro de aproximadamente 6 mm; los grupos eran, un grupo que recibía tanto G47Δ como IL-18, un grupo que recibía G47Δ pero que no recibía IL-18, un grupo que no recibía G47Δ pero que recibía IL-18, y un grupo que no recibía ni G47Δ ni IL-18. El protocolo de dosificación y administración fue el mismo que en el Ejemplo 1.

55 En la Figura 4 se muestran los resultados. El aumento del volumen tumoral se inhibió significativamente en los dos grupos a los que se administró G47Δ (cuadrado blanco y cuadrado negro) en comparación con los dos grupos que no recibieron G47Δ (círculo blanco y círculo negro); sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa entre el grupo que solo recibió G47Δ (cuadrado blanco) y el grupo que recibió tanto G47Δ como IL-18 (cuadrado negro).

60 Estos resultados demuestran que la potenciación de la actividad anticancerosa de G47Δ ocasionada por la coadministración de IL-18 requiere la presencia de linfocitos T y esto se debe a un mecanismo mediado por el sistema inmunitario.

Ejemplo 5Influencia de la administración de IL-18 sobre la replicación viral de G47Δ en tejido canceroso

5 El día 0 se inyectó G47Δ en el tejido tumoral de ratones A/J que tenían un tumor Neuro2a subcutáneo con un diámetro de aproximadamente 6 mm. En estos ratones, se inyectó IL-18 (1 μg/día) por vía intraperitoneal 7 veces en el grupo que recibía IL-18, del día 0 al día 6, mientras que por vía intraperitoneal se inyectó PBS 7 veces en el grupo que no recibía IL-18, del día 0 al día 6. El tumor subcutáneo se extirpó, en cada caso, de 3 ratones, a los 30 minutos, 2 días, 4 días, 7 días y 11 días después de la administración de G47Δ y la titulación de G47Δ en el tumor se midió mediante evaluación en placas.

10 En la Figura 5 se muestran los resultados. En ningún momento se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en la titulación detectada de G47Δ del tumor, entre el grupo que recibía IL-18 (cuadrado negro) y el grupo que no recibía IL-18 (cuadrado blanco), y por lo tanto no se observó ninguna diferencia significativa en la capacidad de replicación viral. Este resultado también se reprodujo en un experimento distinto usando el mismo protocolo.

15 Este resultado demuestra que la potenciación de la actividad anticancerosa de G47Δ mediante la coadministración de IL-18 no tiene ninguna influencia sobre la capacidad de replicación viral de G47Δ.

20

Ejemplo 6Efecto de la coadministración de G47Δ/IL-18 en presencia de empobrecimiento de subconjuntos de linfocitos T

25 Usando anticuerpos anti-CD4 y anticuerpos anti-CD8, se produjo un empobrecimiento de linfocitos T CD4+ o de linfocitos T CD8+ en ratones A/J que tenían tumores Neuro2a subcutáneos para investigar las contribuciones de estas células inmunitarias con respecto al efecto del uso conjunto de G47Δ e IL-18.

30 Ratones A/J que tenían tejido tumoral Neuro2a subcutáneo (de 5 a 6 mm) se dividieron en grupos de 6 a 7 animales cada uno. En el caso de los cuatro grupos a los que se administró G47Δ, el G47Δ (2×10^6 ufp) se administró dos veces por inyección directa en el tejido canceroso, el día 0 y el día 3. En el caso del único grupo de control (identificado como "Control + PBS" en la figura), se administró dos veces solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS) que contenía glicerol al 10 % por inyección directa en el tejido canceroso, el día 0 y el día 3.

35 En la mitad de los grupos que recibían G47Δ se inyectó IL-18 (1 μg/día) por vía intraperitoneal cada día, del día 0 al día 6, mientras que en la otra mitad se inyectó PBS por vía intraperitoneal cada día, del día 0 al día 6.

40 En el ensayo de empobrecimiento de linfocitos T CD4+ (diagrama de la izquierda), se administró anticuerpo anti-CD4 (250 μg) por vía intraperitoneal 1 día antes y el día 2, 6 y 12 de la administración de G47Δ, en uno de los dos grupos que recibían tanto G47Δ como IL-18 y en uno de los dos grupos que recibían G47Δ pero no IL-18. En los grupos que no recibían anticuerpo anti-CD4, se administró IgG de rata como control en la misma cantidad y siguiendo el mismo programa.

45 El ensayo de empobrecimiento de linfocitos T CD8+ (diagrama de la derecha) se realizó de la misma manera que el ensayo de empobrecimiento de linfocitos T CD4+ usando el anticuerpo anti-CD8 (50 μg) en lugar del anticuerpo anti-CD4.

El tejido tumoral se midió y el volumen se determinó mediante longitud × anchura × altura (mm).

50 En la Figura 6 se muestran los resultados. La potenciación en cuanto a la actividad cancerosa de G47Δ debido al uso conjunto de IL-18 no se vio influenciada por el empobrecimiento de linfocitos T CD4+, pero la potenciación de la actividad anticancerosa ocasionada por el uso conjunto de IL-18 se extinguió cuando se realizó el empobrecimiento de linfocitos T CD8+. Esto demuestra que en los efectos debidos a la coadministración de IL-18 participa un mecanismo que requiere linfocitos T CD8+.

55

Ejemplo 7Efecto de la coadministración de G47Δ/IL-18 en tumores cerebrales

60 Se implantaron células Neuro2a 5×10^4 por vía intracerebral en ratones A/J. Al cabo de cinco días, se administró G47Δ (2×10^5 ufp) por inyección en el tejido tumoral en el grupo al cual se había administrado G47Δ, mientras que en el grupo que no recibía G47Δ se administró por inyección PBS, que contenía glicerol al 10 %, en el tejido tumoral. Cada día a partir de la administración de G47Δ, del día 0 al día 6, en el grupo que recibía IL-18 se administró IL-18 (1 μg/día) por inyección intraperitoneal, mientras que en el grupo que no recibía IL-18 se administró PBS por

inyección intraperitoneal cada día a partir de la administración de G47 Δ , del día 0 al día 6. Se midieron los tiempos de supervivencia de los ratones.

En la Figura 7 se muestran los resultados. El tiempo de supervivencia del grupo de coadministración de G47 Δ /IL-18 se prolongó significativamente en comparación con los otros grupos. Esto confirmó que la coadministración de IL-18 manifestaba un efecto potenciador de actividad anticancerosa satisfactorio incluso en un tumor intracerebral, donde es difícil que aparezcan efectos inmunitarios.

Ejemplo 8

Potenciación de la actividad antitumoral del HSV recombinante (administración local) y de la IL-18 (administración sistémica), mediante la administración local de IL-12

Después se confirmó una potenciación de la actividad antitumoral y una potenciación mediada por inmunidad antitumoral sistémica de actividad antitumoral contra tumores distantes para la administración local de IL-12 en combinación con el uso conjunto de G47 Δ (administración local) e IL-18 (administración sistémica) como se describe en los ejemplos anteriores.

En este ejemplo la IL-12 se administró por vía local mediante la administración del HSV recombinante preparado por la inserción de un gen que codifica la IL-12 en el genoma viral de un HSV recombinante.

Para obtener la expresión local de IL-12, primero se construyó ADN viral de G47 Δ que tenía un gen que codificaba la IL-12 insertado como una construcción expresable, como se muestra en la Figura 8, (esta IL-12 insertada en el ADN viral de G47 Δ se denomina "T-mfIL12" en lo sucesivo en el presente documento). En la figura, los recuadros sobre la línea son secuencias invertidas repetidas que flanquean las secuencias únicas U_L y U_S en el ADN del herpes viral. Como se muestra en la figura, la T-mfIL12 tiene una delección de 1,0 kb en las dos copias de γ 34.5, una delección de 312 pb en el sitio ICP47, y una delección de 894 pb entre los sitios Scal-XhoI del gen ICP6. El gen de IL-12 de ratón (identificado como "transgén" en la figura) y el gen LacZ se insertaron en el sitio de delección ICP6. Las flechas gruesas en la figura se refieren a la dirección de la transcripción. Además, N se refiere al sitio de restricción NcoI; Bs se refiere al sitio de restricción BstEII; St se refiere al sitio de restricción StuI; X se refiere al sitio de restricción XhoI; B se refiere al sitio de restricción BamHI; Sc se refiere al sitio de restricción Scal; G se refiere al sitio de restricción BglII; EN se refiere al sitio de restricción EcoNI; y Nr se refiere al sitio de restricción NruI.

Usando ratones A/J que tenían tejido tumoral Neuro2a subcutáneo, de aproximadamente 5 mm de diámetro en ambos costados, derecho e izquierdo, se inyectó T-mfIL12 (1×10^6 ufp, en PBS que contenía glicerol al 10 %) se dos veces en los grupos a los que se había administrado T-mfIL12, el día 0 y el día 3, solo dentro del tejido tumoral en el lado izquierdo, mientras que en los grupos que no recibieron T-mfIL12 solo se inyectó PBS, que contenía glicerol al 10 %, dos veces, el día 0 y el día 3, solo dentro del tejido tumoral en el lado izquierdo (5 o 6 animales en cada grupo).

Por otro lado, se inyectó IL-18 (1 μ g/día) por vía intraperitoneal en los grupos a los que se había administrado IL-18, 7 veces, del día 0 al día 6, mientras en los grupos que no recibieron IL-18, se inyectó PBS por vía intraperitoneal 7 veces, del día 0 al día 6. El tejido tumoral se midió y el volumen se determinó mediante longitud \times anchura \times altura (mm).

En la Figura 9 se muestran los resultados. En la figura, "Control + PBS" se refiere a grupos que no reciben ni T-mfIL12 ni IL-18; "Control + IL-18" se refiere a grupos que no reciben virus, pero en los que se administra IL-18 por vía sistémica; "T-mfIL12 + PBS" se refiere a grupos que no reciben IL-18, pero a los que se administra HSV recombinante que expresa IL-12; y "T-mfIL12 + IL-18" se refiere a grupos en los que la administración local del HSV recombinante que expresa IL-12 se combina con la administración sistémica de IL-18.

Con respecto a los tumores en el lado izquierdo, el aumento del tumor se inhibió significativamente incluso por la administración solo de T-mfIL12 (rombo en blanco) en comparación con los grupos que no reciben el virus (círculo blanco y círculo negro), mientras que se mostró una actividad antitumoral significativamente prolongada por el uso conjunto de T-mfIL12 e IL-18 (rombo negro).

Además, con respecto a los tumores distantes, lado derecho, solamente se observa una inhibición moderada del aumento del tumor en el grupo que solo recibe T-mfIL12 (rombo blanco) en comparación con los grupos que no reciben el virus, mientras que la coadministración de IL-18 (rombo negro) da como resultado una actividad antitumoral claramente potenciada, obteniéndose una diferencia significativa con respecto al grupo que solo recibe T-mfIL12.

Estos resultados demuestran que, para tumores tanto distantes no inoculados con virus como tumores inoculados con virus, la actividad antitumoral del HSV recombinante, que incorpora el gen de IL-12, se potencia mediante la coadministración sistémica de IL-18, incluso en aquellos casos en los que el aumento del tumor no puede inhibirse

eficazmente por la administración sistémica de IL-18 sola.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus del herpes simple recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en un paciente, que comprende la coadministración de interleucina 18 y el virus del herpes simple recombinante, de manera simultánea o secuencial, en donde la coadministración de la interleucina 18 es sistémica, y en donde el gen γ 34.5 y el gen ICP6 del virus del herpes simple recombinante se han deletado o inactivado.
- 10 2. El virus del herpes simple recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la prevención o el tratamiento del cáncer comprenden adicionalmente una administración local de interleucina 12 en un tejido tumoral.
- 15 3. El virus del herpes simple recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, el ADN genómico del virus del herpes simple recombinante que comprende un gen expresable que codifica la interleucina 12.
- 20 4. El virus del herpes simple recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en inyección en un tejido tumoral.
- 25 5. El virus del herpes simple recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en una localización en el paciente fuera del tejido tumoral inyectado con el virus del herpes simple.
- 30 6. El virus del herpes simple recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen ICP47 del virus del herpes simple recombinante también se ha deletado o inactivado.
- 35 7. Interleucina 18 para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en un paciente, que comprende la coadministración de interleucina 18 y de un virus del herpes simple recombinante que se replica selectivamente en células cancerosas, de manera simultánea o secuencial, en donde la interleucina 18 es para administración sistémica y en donde el gen γ 34.5 y el gen ICP6 del virus del herpes simple recombinante se han deletado o inactivado.
- 40 8. Interleucina 18 de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la prevención o el tratamiento del cáncer comprende adicionalmente una administración local de interleucina 12 en un tejido tumoral.
- 45 9. Interleucina 18 de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el ADN genómico del virus del herpes simple recombinante comprende un gen expresable que codifica la interleucina 12.
10. Interleucina 18 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el virus del herpes simple recombinante se administra por inyección en un tejido tumoral.
11. Interleucina 18 de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en una localización en el paciente fuera del tejido tumoral inyectado con el virus del herpes simple.
12. Interleucina 18 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el gen ICP47 del virus del herpes simple recombinante también se ha deletado o inactivado.

FIG.1

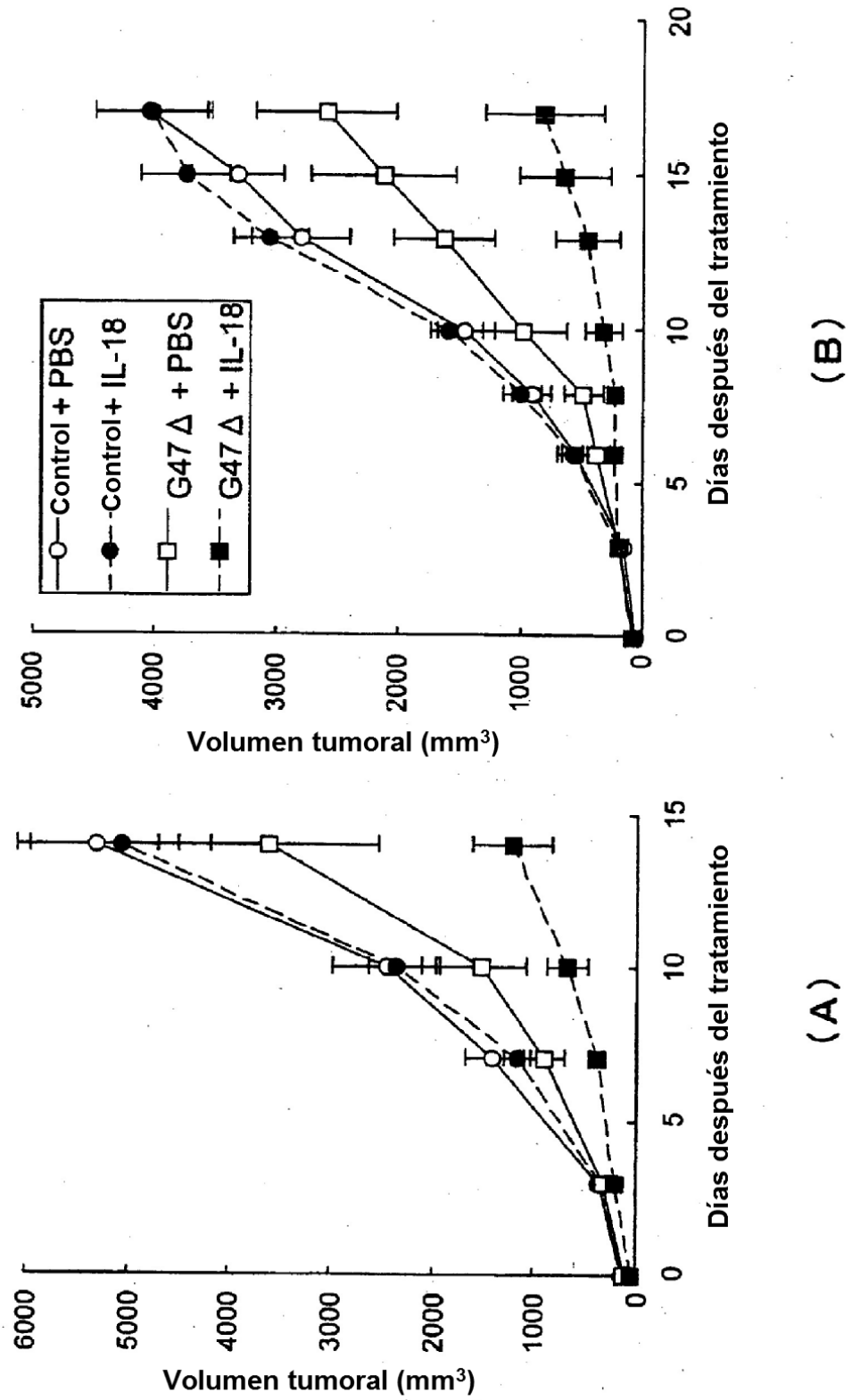
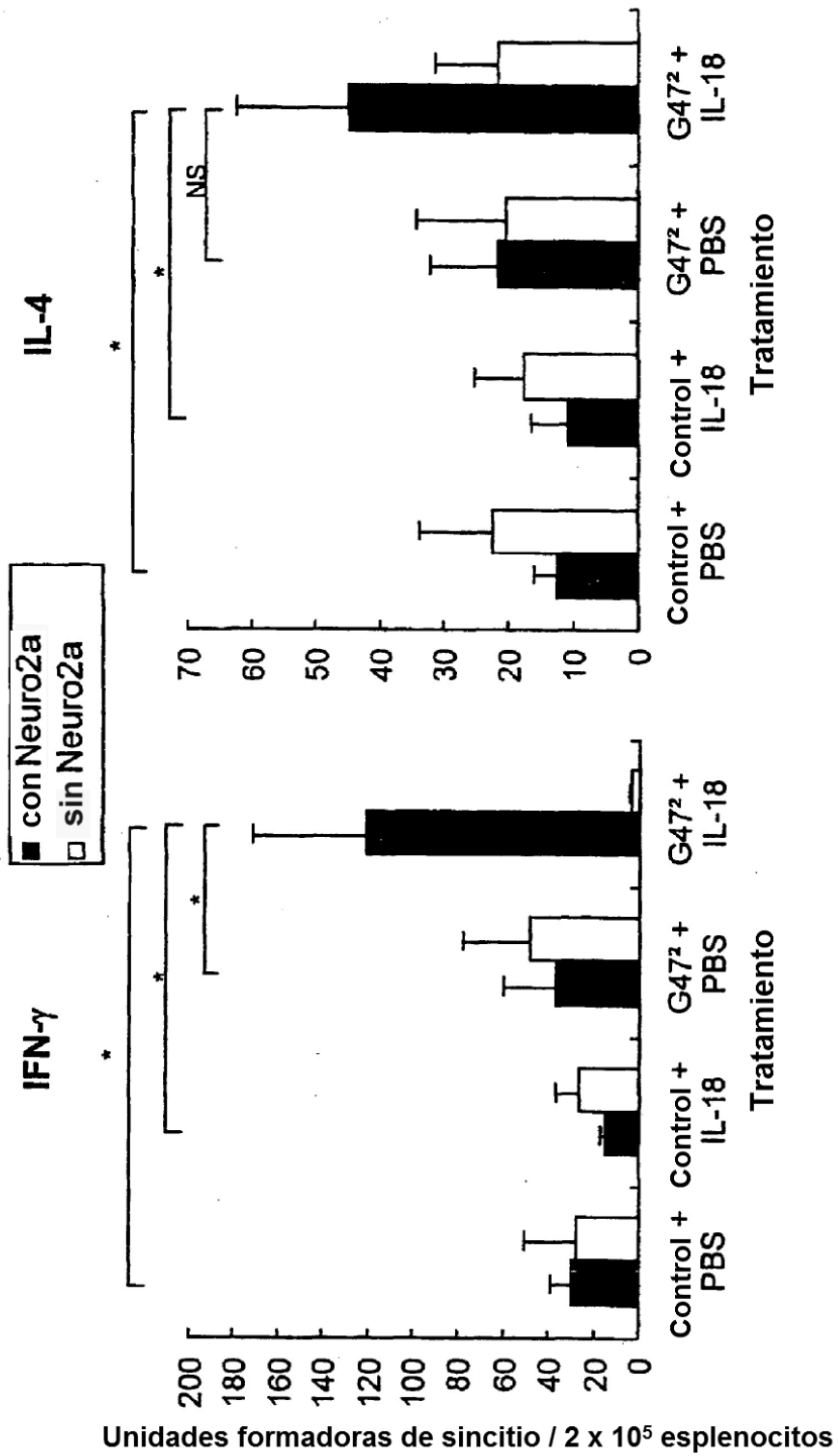


FIG.2



(A)

(B)

FIG.3

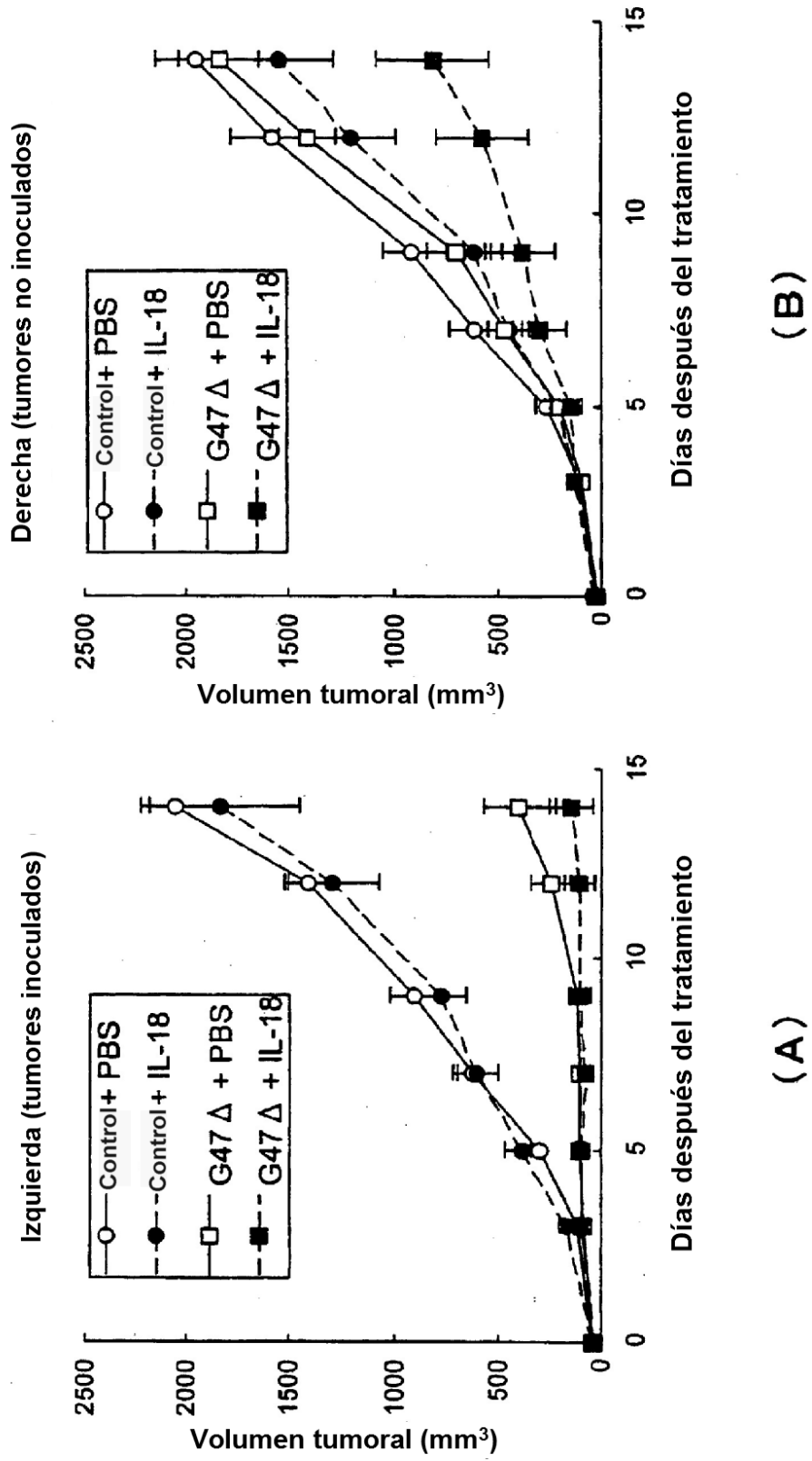


FIG4

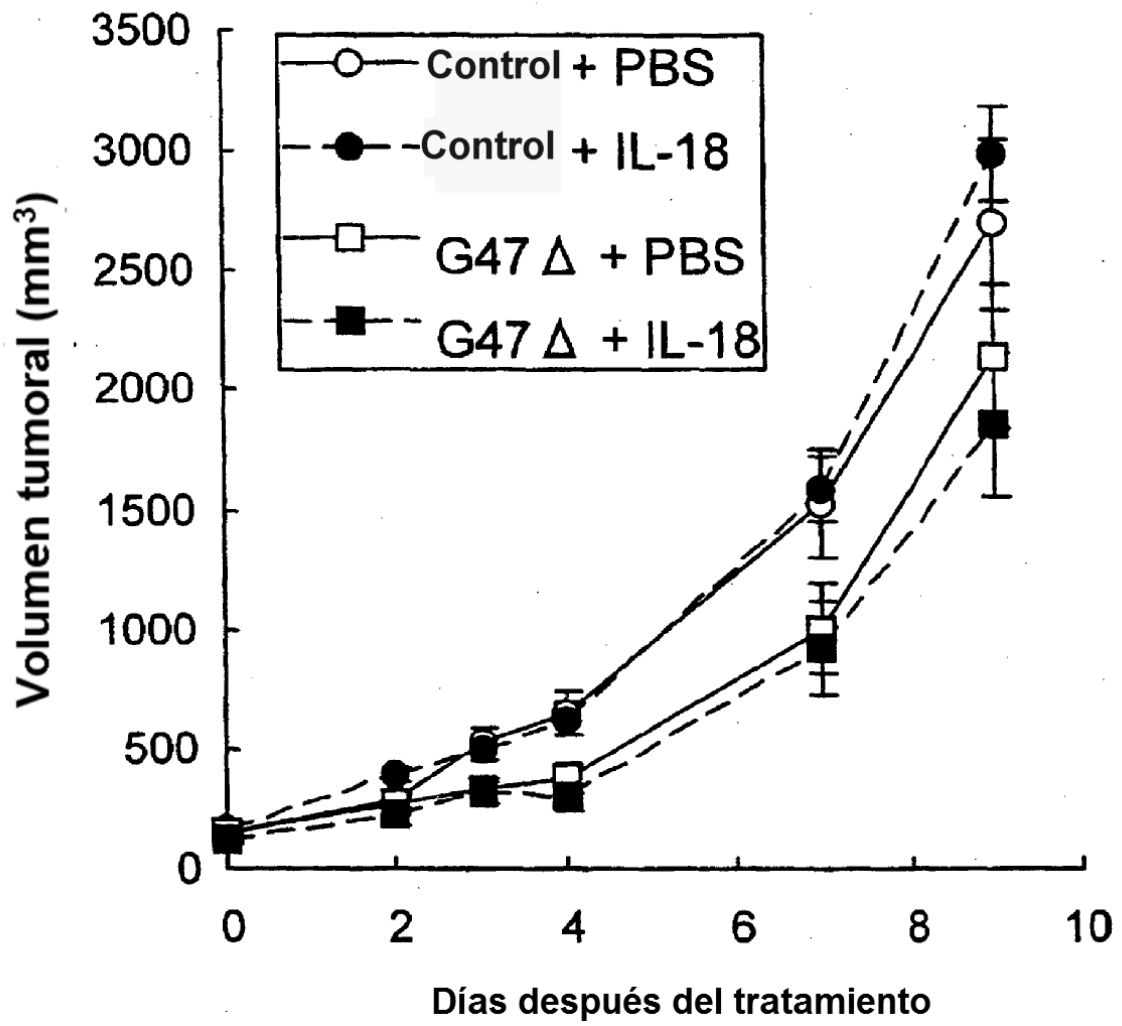


FIG.5

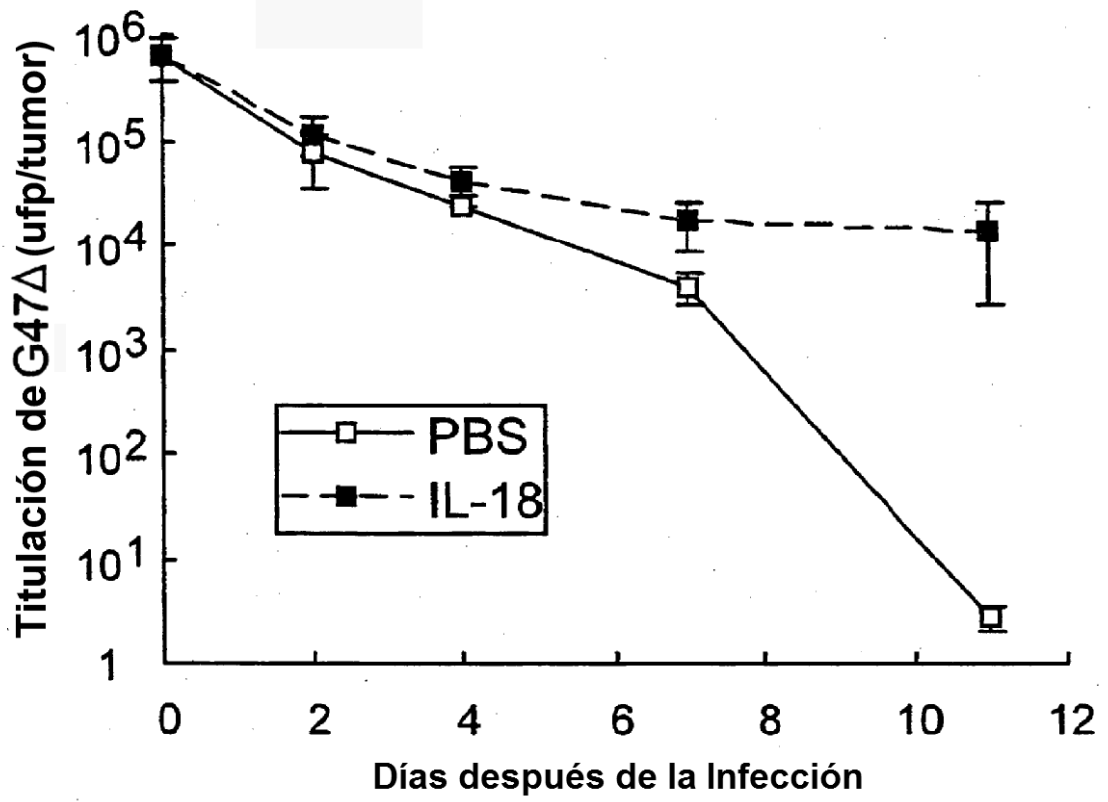
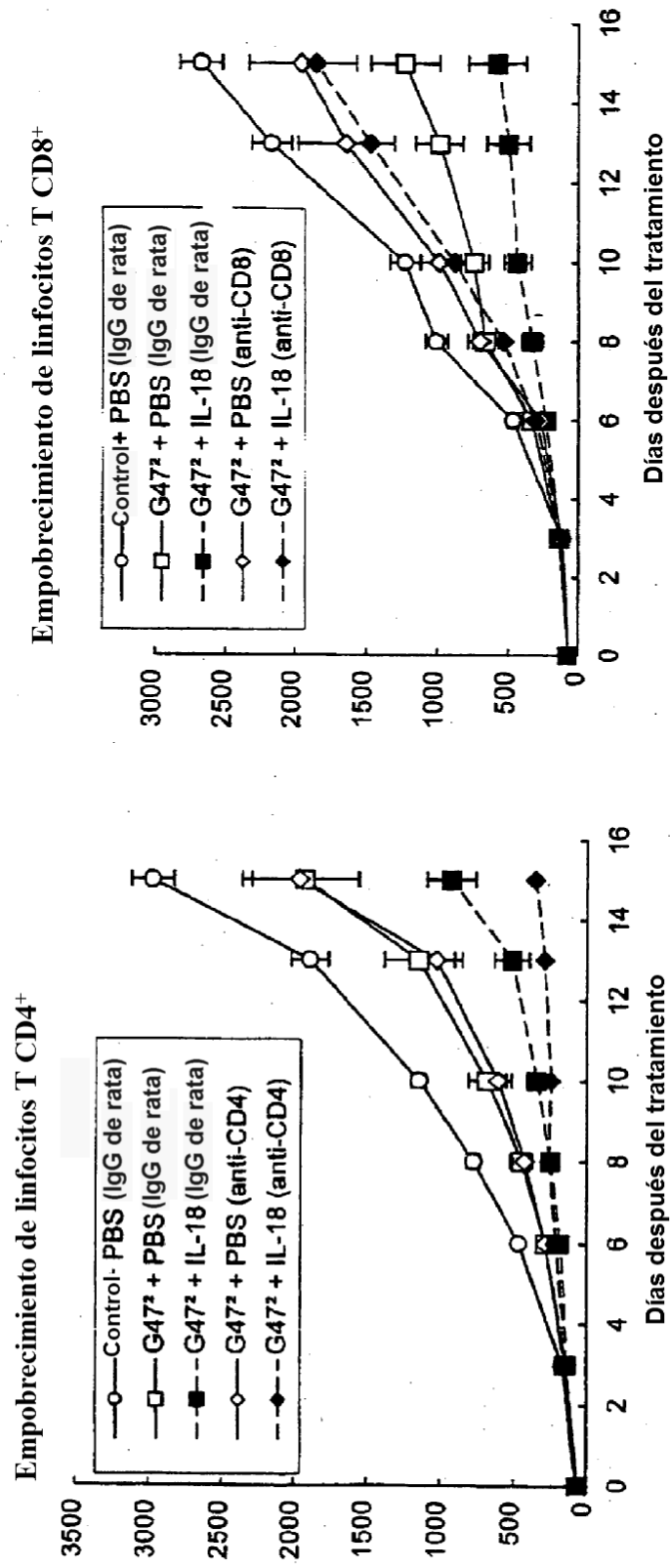


FIG.6



(A)

(B)

FIG.7

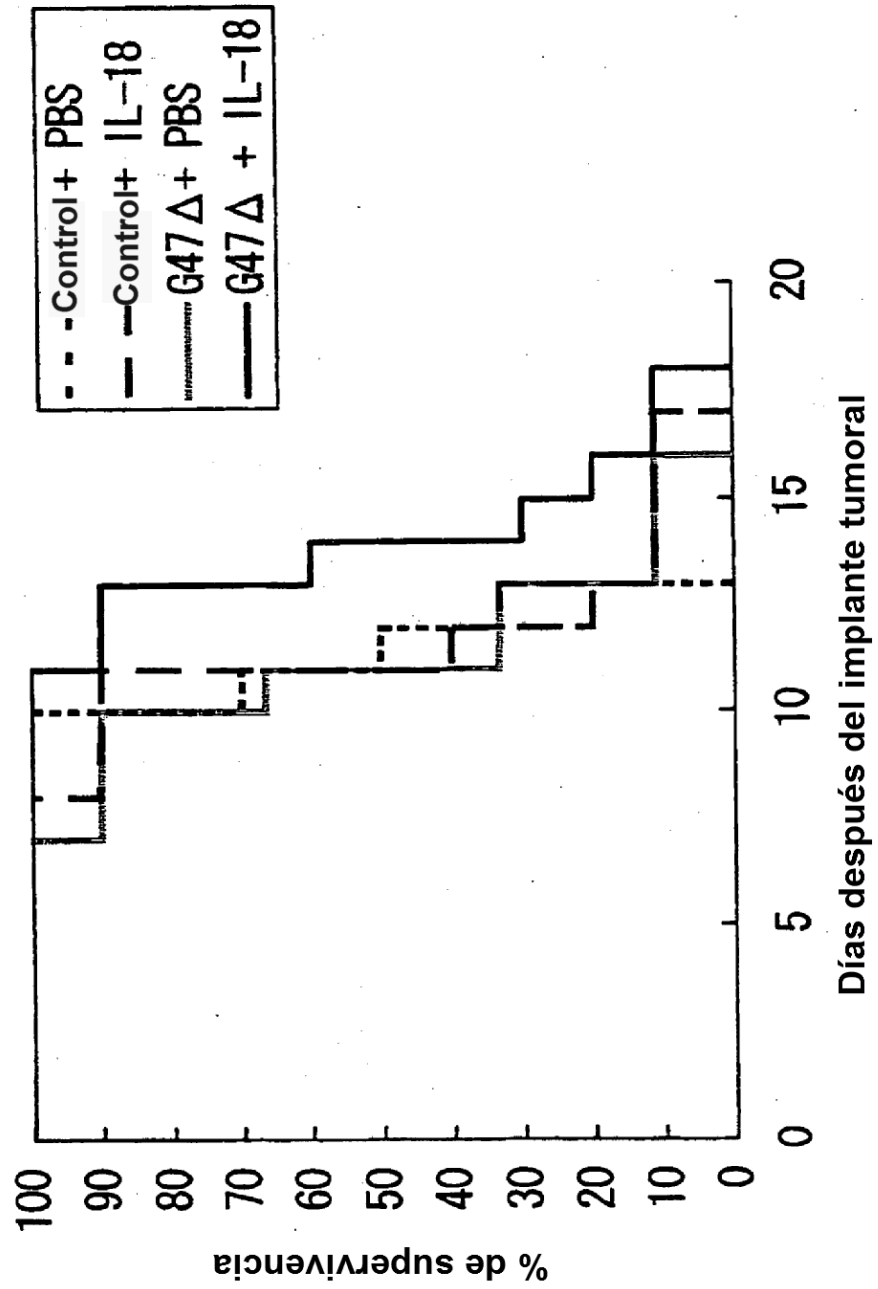


FIG.9

